

# MALDI-TOF MS 和电子光谱技术研究 海兔肝铁蛋白亚基电离和释放铁动力学特性

黄琳<sup>1</sup> 陈旭<sup>1</sup> 林青<sup>1</sup> 朱斌琳<sup>1</sup> 黄河清<sup>\* 1 2</sup>

(厦门大学生命科学院细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室<sup>1</sup>;  
化学化工学院固体表面物理化学国家重点实验室, 化学生物学福建省重点实验室<sup>2</sup>, 厦门 361005)

**摘 要** 选用肽质量指纹谱 (peptide mass fingerprint, PMF) 技术鉴定质谱纯海兔肝铁蛋白 (liver ferritin of *Aplysia*, ALF)。来源于基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 (MALDI-TOF MS) 仪中的激光和基质芥子酸协同解吸海兔肝铁蛋白 (ALF) 为带双电荷、单电荷  $[M+H]^+$  和二聚体的亚基离子, 并可供质谱分析。ALF 亚基的质荷比  $m/z$  分别为 9784.03  $[M+2H]^{2+}$ 、19678.42  $[M+H]^+$  和 39387.80  $[2M+H]^+$ , 其中亚基分子量  $[M+H]^+$  略小于鲨鱼肝铁蛋白 (liver ferritin of shark, SLF)。在弱碱介质 (pH 8.0) 条件下, 电子光谱技术研究指出, 抗坏血酸以 1/2 级反应方式参与 ALF 释放铁全过程, 同时又使 ALF 以一级反应动力学方式释放铁, 呈现两种不同的速率。推测这一异常现象可能与 ALF 含低铁量、亚基调节能力和海兔的进化地位有关。

**关键词** 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱, 亚基解离, 释放铁, 动力学, 进化

## 1 引言

在自然界中, 多数动植物及微生物机体中均存在着一种高效维持体内铁平衡的蛋白质, 简称铁蛋白 (ferritin)<sup>[1-2]</sup>。铁蛋白分子结构由蛋白壳、铁核和电子隧道组成, 其中蛋白壳由 24 个亚基组成, 并表现出高对称性亚基结构特点<sup>[3-4]</sup>。电子显微镜和电泳技术揭示了多数哺乳动物铁蛋白蛋白壳由 H 和 L 类型亚基组成, 其中 H 亚基主要参与负责铁的矿化和铁核晶体形成, 而 L 亚基是提供酸性残基以促进或加速铁的成核作用<sup>[5-7]</sup>。细菌铁蛋白、SLF 和由基因克隆表达的铁蛋白均由单类型亚基组成。由单类型亚基组成的铁蛋白必须同时承担铁储存与释放的功能, 类似于哺乳动物铁蛋白 H 和 L 亚基的生理功能, 但其调控机理尚未清楚<sup>[8-9]</sup>。由于多数哺乳动物铁蛋白的 H (19 kDa)、L (21 kDa) 亚基和 SLF 细菌铁蛋白单类型亚基 (20 kDa) 的分子量很接近, 使低分辨率的电泳技术难以高效分离铁蛋白亚基类型, 从而得出同一种类的铁蛋白, 不同亚基类型的实验结果。目前, 对不同来源于的铁蛋白亚基组成、结构与功能的论点仍有争论<sup>[8-9]</sup>。有关铁蛋白亚基之间的协调作用与执行生理功能的研究并不多, 其主要原因在于缺乏研究铁蛋白亚基及亚基表层电荷分布规律的有效分析技术。如何选用与拓展高效分析技术, 并适合测定铁蛋白 H 和 L 亚基组成、分布与结构, 对科学地阐明铁蛋白亚基的结构与功能至关重要, 但相关研究进展缓慢。有关海兔或其它软体动物肝脏铁蛋白的结构与功能研究尚未见详细报道。

海兔 (*Aplysia*) 归属于腹足纲软体动物, 它是开展分子神经生物学研究的经典模式之一<sup>[10]</sup>。本实验采用 MALDI-TOF MS 和电子光谱技术研究海兔肝铁蛋白 (ALF) 解吸成亚基离子的能力和释放铁动力学规律, 其目的是想了解在弱酸和弱碱介质中, 激光和基质协同解吸由多亚基组成蛋白质成为亚基离子的可能性, 铁蛋白释放铁的动力学规律以及这些规律与动物进化地位的联系, 同时也为阐明低等动物肝脏在进行铁代谢途径和机理提供科学依据。

## 2 实验部分

### 2.1 仪器、试剂与材料

提取铁蛋白所需要的肝脏均取材于活鲨鱼。分离介质二乙基氨基乙基纤维素 (DEAE)-52 购置于

2007-04-18 收稿; 2007-08-01 接受  
本文系国家自然科学基金 (No. 30470372)、福建省高校创新团队培育计划、厦门大学预研基金 (No. xdkjcx20051006) 资助  
E-mail: hqhuang@xmu.edu.cn

华美公司。牛血清白蛋白均购置于 Sangon 公司。三羟甲基氨基甲烷 (Tris) 等有机与无机常规试剂均选用国产产品, 纯度为 96% ~ 99%。采用美国 Bio-Rad 公司生产的蛋白质分离纯化系统制备铁蛋白, 监测波长 280 nm。

## 2.2 粗 ALF 的制备

新鲜海兔肝脏, 去除脂肪组织后, 以湿重 1:1.5 的比例加入蒸馏水。采用组织捣碎机高速捣碎鲨鱼肝成为匀浆 (约 15 min 左右), 随后, 将匀浆液置于恒温 (70~75℃) 水浴锅内热变性处理 20 min 使非耐热杂蛋白变性。匀浆液置于 4℃冷柜冷却后, 以 12000 r/min 高速离心 30 min, 取上清液, 弃去沉淀物。按每 100 mL 上清液加入 35 g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  的比例, 加入  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  于所收集的上清液, 使铁蛋白产生沉淀, 并置于 4℃冰箱过夜, 促使铁蛋白缓慢地析出, 并形成晶体。取出 ALF 晶体混合物, 以 15000 r/min 离心 30 min, 弃上清液, 收集棕色沉淀物。用 0.025 mol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.25) 溶解棕色沉淀物, 并置于透析袋内, 用蒸馏水透析过夜, 除去  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  和其它杂盐。取透析液, 以 12000 r/min 离心 20 min, 弃杂蛋白, 收集上清液备用。此时, 上清液中的蛋白浓度约为 2.6 g/L。

## 2.3 脱盐和电泳制备 ALF

Sephadex G-25 层析介质经预处理后, 装柱 (32 cm × 1.7 cm), 并用 0.025 mol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.25) 平衡。粗 ALF 再次经 Sephadex G-25 层析柱进一步除盐。采用 PAGE 技术分离粗 ALF 样品, 并采用铁染法<sup>[8]</sup>和对比法剥离出 ALF 凝胶蛋白带, 最后采用电泳脱技术分离电泳纯 ALF, 供实验所需。

## 2.4 元素分析

铁蛋白浓度采用改良的 Lowry 方法测定。标准蛋白浓度的配制选用 99% 的牛血清蛋白。ALF 中 P 和 Fe 含量分别采用磷钼钼蓝法和原子吸收分光光度法测定<sup>[9]</sup>。

## 2.5 基质配制和质谱分析

0.1% 三氟乙酸 (TFA) 水溶液和 30% 乙腈 (CAN) 按 7:1 体积比混合成溶液。根据实验要求加入饱和的芥子酸 (SA) 于混合溶液中, 超声波处理 5 min, 并离心 (5000 r/min) 5 min, 收集上清液, 即为饱和基质溶液。样品和饱和基质溶液按 1:1 体积比混合后, 取 0.8 μL 混合物直接点滴在 MALDI-TOF 质谱仪专用样品靶上, 待样品自然干燥后, 将样品靶直接放入质谱仪的靶箱内, 进行样品分析<sup>[11]</sup>。选用配置脉冲氮激光 (337 nm) 离子源的 MALDI-TOF 质谱仪, 采用线性模型分析, 在加速电压控制在 25 kV 等条件下, 每一测定样品随机选择 20~25 个不同的点 (如待测样品有检测出质谱峰, 则累积检测到质谱峰的 30 个点, 每个点激发 25 次), 平均激光脉冲次数在 120 次, 相对激光强度恒定为 50%, 采用标准的牛血清白蛋白外标法标定质谱峰位<sup>[11]</sup>。

## 2.6 电子光谱技术研究 ALF 释放铁动力学

参考文献 [8] 和 [12] 电子光谱技术, 研究铁蛋白释放铁动力学的技术和方法。选用张凤章等<sup>[13]</sup>已建立的铁蛋白释放铁的动力学方程式进行分析、计算和改良, 建立更加科学的动力学方程式。

# 3 结果与讨论

## 3.1 肽质量指纹谱技术鉴定 ALF

采用上述铁蛋白制备技术对海兔肝进行分离、提取、纯化, 所获得铁蛋白样品经 PAGE 分离后显示出单条层析带。SDS-PAGE 实验结果显示, 经 PAGE 纯化后的 ALF 样品同样也呈现单一的蛋白带, 这说明了 ALF 由单类型亚基组成, 它的亚基类型与由单类型亚基组成的 SLF 和细菌铁蛋白很相似, 但明显不同于由 H 和 L 亚基类型组成的哺乳动物铁蛋白<sup>[5, 14]</sup>。PMF 技术可作为鉴定蛋白质种类的有效手段之一。为了进一步证实已获得电泳蛋白质样品是否为 ALF, 本实验选用本课题组编写的 nubish peak killer (RPK) 分析软件, 可直接删去图 1 中胰酶自降解产物和基质等所形成的干扰质谱峰, 并筛选出 ALF 亚基酶解产物所对应的肽质谱峰, 从而提高鉴定 ALF 的可信度, 这项分析技术同样也适合于鉴定其它蛋白质。参考图 1 测定结果和 RPK 软件提供的数据, 选用 MASCOT 检索网站中的 SWISS-PORT、M SDB 和 NCBi 数据库进行检索与比对。经检索和分析后, 发现 ALF 与鸡和鼠的铁蛋白 H 亚基一级结

构具有 60%的同源性。由于目前国际各大数据库中鸡和鼠的铁蛋白 H 亚基一级结构来自它们各自的 cDNA 序列直接翻译而成的蛋白质一级结构,与其真实的一级结构存在着一定的差异,导致 PMF 分析技术和数据库比对法鉴定蛋白质过程中所获得覆盖率数据偏低。尽管鉴定 ALF 只能获得 60% 覆盖率,但仍然可认为 ALF 与鸡和鼠的铁蛋白 H 亚基具有较高同源性论点的可靠性。

3 2 ALF 亚基质谱特性

近期研究指出: SLF 由单类型亚基组成<sup>[14]</sup>。在基质芥子酸辅助下,来源于质谱仪激光器的激光能解离 SLF 成为亚基  $[M^+]$  和亚基聚合体离子,并可被飞行时间质量分析器所检测,其亚基的  $m/z$  分别为 10611.07、21066.52、41993.16 和 63555.64 即认为亚基分子结构分别为  $[M + 2H]^{2+}$ ,  $[M + H]^+$ ,  $[2M + H]^+$  和  $[3M + H]^+$ <sup>[14]</sup>,但相关亚基解离成分子离子的机理尚未清楚。实验采用 SDS-PAGE 研究

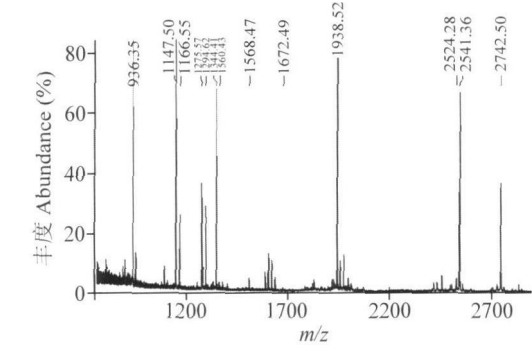


图 1 ALF 质量肽指纹谱的质谱分析  
Fig 1 MS analysis of peptide mass fingerprinting in liver ferritin of aplysia (ALF)

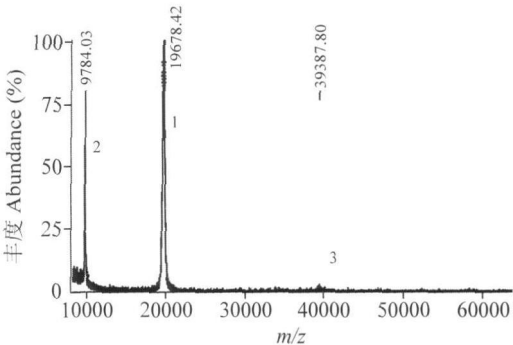


图 2 ALF 亚基质谱图  
Fig 2 Mass spectrum of subunit in ALF

发现了 ALF 由单类型亚基组成,其亚基分子量约为 19 kDa。图 2 是 ALF 亚基质谱图,图中显示出 3 个质谱峰,其  $m/z$  分别为 9784.03 ( $[M + 2H]^{2+}$ ), 19678.42 ( $[M + H]^+$ ) 和 39387.80 ( $[2M + H]^+$ ),亚基聚合态的类型数目和所对应的  $m/z$  均明显低于 SLF,即 ALF 和它亚基分子量均低于 SLF。实验选用 PAGE 方法证实这一论点。不同来源铁蛋白之间的亚基聚合态的类型数目不同与亚基之间外表层的疏水键之间的相互作用强度不同有关。可参与疏水键数目越多,所形成的聚合态数目也多。这一现象也反映出 SLF 和 ALF 亚基之间的一级结构存在较为明显的差异。

在 pH 2.0 条件下,脱铁核铁蛋白蛋白壳能解离成游离的亚基,并随着 pH 值递增,游离的亚基可重新组装成脱铁核铁蛋白<sup>[15]</sup>。采用类似方式,铁蛋白可通过亚基解离途径直接捕获各类有机小分子及药物<sup>[15-15]</sup>。根据前人的研究报道和图 2 实验结果,拟出 MALDI-TOF MS 测定铁蛋白亚基的示意图,并阐明其机理,具体如图 3 所示。

根据图 3 和前人的研究结果<sup>[12-14]</sup>,作者提出 MALDI-TOF MS 引起 ALF 亚基解离且形成分子离子途径的观点,具体如下: (1) 基质芥子酸和 TFA 提供酸性微环境,削弱 ALF 亚基之间的相互作用力,在有机溶剂乙腈促进下,ALF 处于易解离成亚基的状态; (2) 由于带有铁离子的蛋白质可能比其它蛋白质更易接受激光能量的特性<sup>[16]</sup>,基质辅助提高激光解吸/电离多肽离子化率和绝对强度,使 ALF 亚基之间的相互作用强度进一步降低; (3) 由于在解吸亚基离子且供飞行时间质谱仪质量分析器检测之前,ALF 部分亚基出现去折叠现象。此时增强了已解离后的亚基之间的疏水基团相互作用强度,并形成亚基二聚体或形成双电荷单亚基类型,因而可获得图 2 结果,显示出  $[M + 2H]^{2+}$ 、 $[M + H]^+$  和  $[2M + H]^+$  亚基分子结构式。为了证实上述论点科学性,比较在弱酸和弱碱性介质下,ALF 释放铁的动力学过程与规律,拟进一步了解 ALF 亚基之间的稳定性、柔性调节能力和形成亚基离子的可能性,为更加科学地阐明图 2

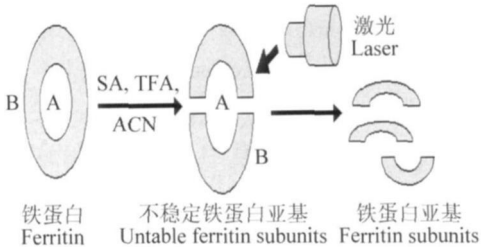


图 3 激光和基质解吸 ALF 成亚基离子过程  
Fig 3 Generating process of subunit ion by laser and matrix desorption in ALF

实验结果和图 3 模型提供实验证据。

3 3 在弱碱介质下, ALF 释放铁的动力学

抗坏血酸(维生素 C) ( - 11. 0 mV, 相对于标准氢电极电位, 下同)和  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  均是双电子供体, 其中抗坏血酸的氧化还原电位高于铁蛋白 ( - 245. 0 mV) <sup>[17]</sup>。从表观数据推测, 抗坏血酸不可能作为电子供体参与铁蛋白进行释放铁反应, 但图 4 是以抗坏血酸为电子供体, 在弱碱介质中 (pH 8. 0), ALF 释放铁的动力学全过程。ALF 含铁量约为  $530 \text{ Fe}^{3+} / \text{ALF}$ , 明显低于绝大多数由 H 和 L 亚基类型组成的哺乳动物铁蛋白含铁量 (约为  $2400 \text{ Fe}^{3+} / \text{ALF}$ ), 但与细菌铁蛋白含铁量较为相似 <sup>[18]</sup>。推测这一现象与高、低等动物之间在进行铁代谢过程中所需求的铁量和供铁速率需求有关。同时反映出由单、双类型亚基组成的铁蛋白储存铁的能力与数量不同。不同类型的亚基执行着不同的生理功能, 但由单类型亚基结构组成的铁蛋白, 其亚基必须起着多种生理功能的作用, 否则它无法同时承担储存和释放铁的重要生理功能。参考文献 [19], 可认为  $\alpha'\alpha$ -dipyridyl 螯合铁蛋白铁核中的  $\text{Fe}^{2+}$  速率远远大于还原剂还原  $\text{Fe}^{3+}$  为  $\text{Fe}^{2+}$  的速率。此时, 铁蛋白释放铁的限制性步骤应该是还原剂参与还原铁核中  $\text{Fe}^{3+}$  组分的速率, 即考虑铁蛋白铁核中未释放铁的含量, 而不是考虑已释放铁的含量。这一认定方式不同于通常酶催化动力学的计算式。早期所建立的释放铁动力学方程  $(C_{\text{max}} - C_t)^{1/2} = kT_i - T_i$  <sup>[20]</sup>, 其中  $(C_{\text{max}} - C_t)^{1/2}$  计算模式主要考虑在单位时间内 ( $T_i$ ) 还未释放的铁组分, 而不是考虑已释放的铁组分 ( $C_t$ )。所以, 对已建立铁蛋白释放铁的动力学方程式应修正为  $(C_{\text{max}} - C_t)^{1/2} = kT_i$  更为合理。由于抗坏血酸的分子尺寸明显大于铁蛋白的物质交换隧道宽度 (0.3~0.4 nm), 因而抗坏血酸只能借用络合铁蛋白途径改变蛋白壳构象, 提高蛋白壳的氧化还原电位, 向铁蛋白提供电子, 并供铁的还原与释放。把图 4 结果代入  $(C_{\text{max}} - C_t)^{1/2} = kT_i$  方程后作图, 可获得图 5 结果, 显示线性对应关系。这一实验现象说明了在弱碱介质 (pH 8. 0) 下, 用抗坏血酸以 1/2 级方式参与铁还原与释放 (图 5), 抗坏血酸还原 ALF 铁核中的铁组

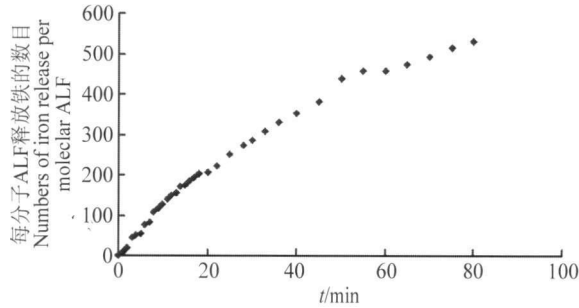


图 4 以抗坏血酸为电子供体, ALF 释放铁的动力学全过程 (pH 8. 0)

Fig 4 Complete process of iron release reduced with ascorbic acid as electronic donor from the ALF at pH 8. 0

成全过程中未发生差异速率现象。进一步实验表明, 作者拟在弱碱介质中, 采用 MALDI-TOF MS 技术测定 ALF 亚基的  $m/z$ , 但均未获得成功。显然在弱碱介质下, ALF 亚基分子结构由柔性转变为刚性结构, 亚基之间的相互作用强度增加。激光和基质均无法直接解吸 ALF 且形成亚基分子离子, 供质谱分析。ALF 亚基稳定性在弱碱介质中高于在弱酸介质中。ALF 易被激光解吸成亚基离子, 可能与铁蛋白复杂的亚基结构体系和在弱酸介质中呈现出不稳定现象有关。

3 4 在弱碱介质下, ALF 异常释放铁过程

作者前期的研究结果已报道, 如把铁蛋白释放铁全过程代入  $(C_{\text{max}} - C_t)^{1/2} = kT_i$  方程, 并获得  $(C_{\text{max}} - C_t)^{1/2}$  与  $T_i$  的线性对应关系。以  $\lg(C_{\text{max}} - C_t)$  以与  $T_i$  作图, 同样也能获得线性对应关系。这一现象说明了还原剂  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  或抗坏血酸均以 1/2 级动力学途径参与铁还原与释放, 而铁蛋白自身释放

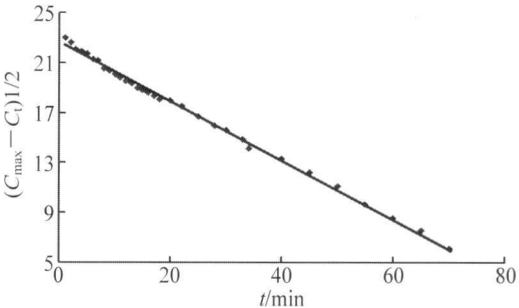


图 5 根据图 4 结果代入动力学方程  $(C_{\text{max}} - C_t)^{1/2} = kT_i$  作图

Fig 5 Results shown in Fig 6 were obtained by a kinetic equation  $(C_{\text{max}} - C_t)^{1/2} = kT_i$  according to Fig 4 results  $C_{\text{max}}$ : 铁蛋白释放铁最大量 (the maximum numbers of iron release).  $C_t$  和  $T_i$ : 在单位时间内 ( $T_i$ ) 内, 铁蛋白释放的铁量 ( $C_t$  and  $T_i$ : the numbers of iron release ( $C_t$ ) according to desire reactive time).

铁的全过程却遵循一级反应动力学 ( $\text{Fe}^{3+}$  转化成  $\text{Fe}^{2+}$ )。根据图 4 结果, 并以  $\lg(C_{\max} - C_t)$  与  $T_t$  作图, 获得图 6A、B 结果, 说明了 ALF 释放铁全过程表现出非线性对应关系, 并呈现出两种不同释放铁的速率, 其速率转折点约为 42 min 但均遵循一级反应动力学规律。如果以  $\lg C_t$  与  $T_t$  作图, 可获得图 6C 结果, 其释放铁动力学曲线变化趋势类似于图 4 结果; 不遵循一级反应动力学规律, 呈混合级动力学过程。比较由 H 和 L 亚基类型组成的哺乳动物铁蛋白和由单类型亚基组成的细菌铁蛋白释放铁动力学过程和规律, ALF 表现出异常的释放铁现象。海兔属于低等软体动物, 从进化地位考虑, 它高于细菌, 但低于哺乳动物地位, 也许是海兔在动物界中归属于对储存和释放铁过程中具有特殊需求的途径的动物之一, 使 ALF 释放铁动力学过程兼有细菌和哺乳动物铁蛋白特性。铁蛋白释放铁动力学特性是否也可作为评判生物进化地位或时代等指标还有待于进一步研究, 但它对拓展生物分析化学应用领域将有一定的促进作用, 并具有重要的科学意义和价值。

### 3.5 小结

(1) PAGE、SDS-PAGE 和 MALDI-TOF MS 等分析技术证实了 ALF 由单类型的亚基组成, 其亚基分子量为 19678.42 Da ( $[\text{M} + \text{H}]^+$ ); (2) 酸性介质 (例如: 酸性基质) 削弱 ALF 亚基之间相互作用强度, 协助来源于 MALDI-TOF MS 的激光解吸 ALF 成为亚基离子。在弱碱介质条件, ALF 亚基之间的相互作用强度增强, 此时难于直接测定 ALF 亚基。提出 MALDI-TOF MS 解吸 ALF 成亚基离子, 并可供质谱分析的简易模型图。ALF 亚基之间的相互作用强度与介质的酸碱度有关; (3) 选用释放铁动力学技术研究在弱酸弱碱条件下, ALF 释放铁的动力学及规律, 提出抗坏血酸以 1/2 级反应方式参与 ALF 释放铁全过程同时, 又使 ALF 以一级反应动力学方式释放铁, 并呈现两种不同的速率, 提出这一异常现象可能与 ALF 含低铁量、亚基调节能力和海兔的进化地位有关的观点, 所获得的动力学参数能更加科学合理地阐明选用 MALDI-TOF MS 技术分析高分子量 ALF (约为 440 kDa) 的亚基理化特性和释放与储存铁的机理。

### References

- Huang H Q, Watt R K, Frankel R B, Watt G D. *Biochemistry*, **1993** 32(8): 1681~1687
- Kim J W, Choi S H, Lillehei P T, Chu S H, King G C, Watt G D. *J. Electroanal. Chem.*, **2006** 601(1): 8~16
- Toussaint L, Bertrand L, Hue J, Crichton R R, Declercq J P. *J. Mol. Biol.*, **2007** 365: 440~452
- Sinsek E, Kiliç M A. *J. Magnetism and Magnetic Mater.*, **2005** 293: 509~513
- Huang H Q, Xiao Z Q, Lin Q M, Chen P. *Anal. Chem.*, **2005** 77(6): 1920~1927
- Polanans J, Ray A D, Watt R K. *Inorg. Chem.*, **2005** 44(9): 3203~3209
- Kim I, Hoselin H A, Strongin D R, Dougkas T. *Chem. Mater.*, **2002** 14(11): 4874~4879
- Kong B, Huang H Q, Lin Q M. *J. Prot. Chem.*, **2003** 22(1): 61~76
- Bacelo B E, Jr, Binning R C. *Inorg. Chem.*, **2006** 45(25): 10263~10269
- Garden R W, Shippey S A, Li L J, Moroz T P, Sweedler J V. *Proc Natl Acad Sci USA*, **1998** 95(27): 3972~3977
- Zeng X H, Huang H Q, Chen D S, Jin H W, Cai Z. *Intem. J. Mass Spectra*, **2007** 261(1): 108~114
- Chen Ping (陈平), Huang He-Qing (黄河清), Lin Qing-Mei (林庆梅), Chen Xu (陈旭), Huang Hu-Ying (黄慧英). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), **2007** 35(5): 667~671
- Zhang Feng-Zhang (张凤章), Huang He-Qing (黄河清), Xu Ling-Shu (许良树). *Acta Biophys. Sinica* (生物物理学报), **1998** 14(1): 13~19

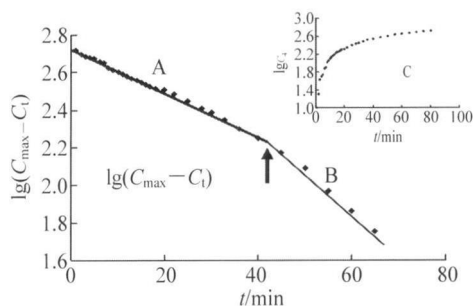


图 6 根据图 4 结果代入动力学方程  $\lg(C_{\max} - C_t)^{1/2} = kT_t$  作图

Fig 6 Results shown in Fig 4 were obtained by a kinetic equation  $\lg(C_{\max} - C_t)^{1/2} = kT_t$  according to Fig 4 results

$C_{\max}$ :  $C_t$  和  $T_t$  在单位时间内 ( $T_t$ ) 内, 铁蛋白释放的铁量;  $C_{\max}$ : 铁蛋白释放铁最大量 (the maximum numbers of iron release);  $C_t$  and  $T_t$ : the numbers of iron release ( $C_t$ ) according to desire reactive time ( $T_t$ ).

- 14 Huang H Q, Xiao Z Q, Lin Q M, Cai Z, Chen P. *Biophys Chem.*, **2004**, 111(2): 213~222
- 15 Choi H, Ahn J Y, Sin S J. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **2005**, 327(2): 604~608
- 16 Zhou H u+Q in(卓慧钦), Huang H e-Q ing(黄河清), Weng Lu-Na(翁露娜), Huang H u+Y ing(黄慧英). *Chem. J. Chin. Univ.* (高等学校化学学报), **2007**, 35: 791~796
- 17 Huang H e-Q ing(黄河清), Lin Q ing-M ei(林庆梅), Zhang Feng-Zhang(张凤章), Chen Zhong(陈中), Luo Zhan-Bo(雒占波), Xu Liang-Shu(许良树). *Chinese J. Biochem. Mol. Biol.* (中国生物化学与分子生物学报), **1999**, 15(1): 10~14
- 18 Hu X iao-Hui(胡晓慧), Huang H e-Q ing(黄河清). *J. Xiamen Univ.*(厦门大学学报), **2006**, 45(5): 717~721
- 19 Huang H e-Q ing(黄河清), Lin Q ing-M ei(林庆梅), Chen X iang(陈翔). *Acta Biophys. Sinica* (生物物理学报), **2000**, 15(1): 158~165
- 20 Huang H e-Q ing(黄河清), Zhang Feng-Zhang(张凤章), Lin Q ing-M ei(林庆梅), Zeng Run-Y ing(曾润颖), Q iu Xue-Hu(邱雪慧), Xu Liang-Shu(许良树). *Acta Zoologica Sinica* (动物学报), **1999**, 45(2): 170~177.

## Desorption/Ionization of Subunit and Kinetics of Iron Release Revealed with Matrix-assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry and Electronic Spectrum in Liver Ferritin of *Aplysia*

Huang Lin<sup>1</sup>, Chen Xu<sup>1</sup>, Lin Q ing<sup>1</sup>, Zhu Bin-Lin<sup>1</sup>, Huang H e-Q ing<sup>\*1,2</sup>

(Key Laboratory of the Ministry of Education for Cell Biology and Tumor Cell Engineering, School of Life Sciences<sup>1</sup>;

State Key Laboratory of Physical Chemistry of Solid Surface, The Key Laboratory of Chemical Biology

of Fujian Province<sup>2</sup>, Xiamen University, Xiamen 361005)

**Abstract** Liver ferritin of *Aplysia* (ALF) with purity of mass spectrometry has been identified by a technology of peptide mass fingerprint. Both lasers coming from the MALDI-TOF MS and matrix sinapic acid together decomposed ALF into molecular ion of the subunit for MS analysis, showing three molecular ions such as single subunit with double  $[M + 2H]^{2+}$  and single  $[M + H]^+$  charges, and dimeric subunit with single charge  $[2M + H]^+$ . The ratio of mass to charge ( $m/z$ ) of these ions is divided to be 9784.03, 19678.42 and 39387.80, respectively. The molecular weight of ALF was somewhat little than that of liver ferritin in shark (SLF). In weak basic medium (pH 8.0), the experimental results used with electron spectral technology showed that ascorbic acid as a 1/2 order reaction, reduced the whole iron component within the ferritin core for releasing, which resulted in ALF released the iron as first-order law rather than half-order law, showing two different rates of iron release. The results suggested that these novel phenomena be tightly connected with the low iron content and the capacities of subunit regulation in ALF, and with evolution level.

**Keywords** Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrum (MALDI-TOF MS), subunit desorption, iron release, kinetics, evolution

(Received 18 April 2007; accepted 1 August 2007)